

岛 β 细胞所致的自身免疫性疾病。迄今对自身免疫病的治疗方案多不理想,目前常规采用的免疫抑制手段不但降低患者免疫力,也使疾病容易复发。理想的治疗自身免疫病的策略是特异性清除自身反应性 T 细胞,重建对自身组织抗原的免疫耐受。而自身免疫调节因子(AIRE)恰在胸腺阴性选择中具有调控组织限制性抗原(TRA_s)表达、促进自身反应 T 细胞的清除、参与免疫耐受诱导的功能。因此,我们设想利用基因转导手段操纵骨髓细胞中 AIRE 的表达,通过模拟胸腺的阴性选择,诱导免疫耐受,为 I 型糖尿病的防治提供新策略。

【设计思路】 本实验拟通过以自身免疫糖尿病小鼠(NOD 鼠)为模型,移植表达 AIRE 的骨髓细胞,使其在 NOD 鼠体内通过调控 TRA_s 的表达清除自身反应性 T 细胞,观察其诱导特异性清除对胰腺组织特异性 T 细胞的作用及对 NOD 鼠糖尿病发生的影响,探索 I 型糖尿病防治新方法。

【实验内容】 (1)构建编码小鼠 AIRE 的逆转录病毒载体,将其转入骨髓 DCs 细胞。(2)将转导 AIRE 的骨髓 DCs 细胞移植至经放射线照射的 NOD 小鼠,获得 NOD 嵌合鼠。(3)采用流式细胞术检测 NOD 嵌合鼠胸腺和脾脏中 GFP⁺ 细胞数量,检测 NOD 鼠嵌合程度。(4)采用 real-time PCR 法、流式细胞术检测 Ins2 mRNA 水平和蛋白水平表达变化,检测 AIRE 对 TRA_s 的调控作用。(5)检测 NOD 鼠糖尿病发生时间和程度以及其病理学和胰岛自身抗体的改变。

【材料】 NOD 鼠、编码 AIRE 的逆转录病毒载体、real-time PCR 仪、流式细胞仪、葡萄糖检测试剂盒、尿糖试纸、ELISA 试剂盒等。

【可行性】 前期工作中,以胸腺阴性选择为理论依据,对 AIRE 的表达、分布及其在自身耐受中的作用进行了系统、深入的研究,现以基因转导和骨髓细胞移植为技术手段,切实可行。

【创新性】 本研究首次将基因操纵和骨髓细胞移植两大先进技术相结合,利用 AIRE 能特异性清除自身反应性 T 细胞的功能,探究治疗 I 型糖尿病的方法,为自身免疫疾病的防治提供新思路。

关键词: 自身免疫性糖尿病;骨髓移植;AIRE;TRA_s

B-S2-12

Cx43 形成的 GJIC 在 NGF 诱导 PC12 细胞神经元样分化中作用的研究

白 玲;指导教师:刘海岩

吉林大学 2010 级临床医学七年制

【立论依据】 在神经系统的发育和修复过程中,神经元间的细胞通讯在细胞的静息、增殖、分化和凋亡过程的发生发展中发挥着重要作用。细胞间通讯有缝隙连接、膜表面分子接触通讯和化学通讯三种方式,而缝隙连接(GJ)是细胞间直接通讯的唯一方式。缝隙连接蛋白(connexin)是 GJ 结构和功能的基础,在缝隙连接蛋白家族中,Cx43 在中枢神经系统的发育过程中发挥重要作用。功能性缝隙连接(GJIC)是通过缝隙连接在相邻细胞间传递氨基酸、离子、小分子等的一种通讯方式。研究表明,神经生长因子(NGF)可以促进 Cx43 磷酸化,同时可以诱导嗜铬细胞瘤 PC12 细胞分化而产生与交感神经元相似的神元。但是 Cx43 形成的功能性缝隙连接(GJIC)在 NGF 诱导 PC12 细胞分化中的作用尚不清楚。因此,本研究拟阐述 Cx43 形成的 GJIC 在 NGF 诱导 PC12 细胞分化中的作用。

【设计思路】 本实验拟构建 Cx43 稳定转染的 PC12 细胞系,并检测 Cx43 形成的 GJIC 的功能。NGF 诱导 PC12 细胞和 Cx43 稳定转染的 PC12 细胞,分析 Cx43 形成的 GJIC 在 NGF 诱导 PC12 细胞神经元样分化过程中的作用,为神经损伤和修复提供新的研究靶点。

【实验内容】 (1)构建 Cx43 稳定转染的 PC12 细胞系;(2)实验分组:NGF 诱导 PC12 细胞组,NGF 诱导 Cx43 稳定转染的 PC12 细胞组,NGF 诱导 PC12 细胞组+缝隙连接抑制剂(CBX),NGF 诱导 Cx43 稳定转染的 PC12 细胞组+CBX;(3)形态学观察和 NES 免疫荧光细胞化学染色检测细胞分化率;(4)Dye Coupling 检测 Cx43 形成的

GJIC。

【材料】 PC12 细胞;NGF;Cx43 真核表达质粒;Cx43 引物和抗体;CBX;NES 单克隆抗体;FITC-IgG。

【可行性】 本研究前期研究工作通过形态学观察及 Image 软件测量显示在一定范围内,NGF 量的增加可以有效提高 PC12 细胞的分化水平,课题组成员熟练掌握相关实验的方法和技术;研究室能提供相关的仪器和材料。实验思路清晰,实验过程明确。

【创新性】 本研究应用 NGF 诱导 PC12 细胞分化模型,探究 Cx43 形成的 GJIC 在 NGF 诱导 PC12 细胞分化过程中的作用,从而为神经损伤和修复提供新的研究依据和调控靶点。

关键词: Cx43;GJIC;NGF;分化;PC12 细胞

B-S2-13

CDK5 介导的 AMPK 磷酸化对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖及分化的影响

袁志鹏¹,曾茂君¹,黎梅¹,周元武¹,包昌红¹,唐媛²,李爽³;指导教师:李先辉

1. 吉首大学 2011 级临床医学
2. 吉首大学 2012 级临床医学
3. 吉首大学 2013 级临床医学

【立论依据】 AMPK 是细胞及整体能量稳态的调控器。代谢综合征状态下,机体组织广泛存在 AMPK 活性下降,但 AMPK 如何失活仍存许多疑问。因此,弄清楚 AMPK 的失活机制对阐明代谢综合征的发病机制具有重要意义。

【设计思路】 有研究表明 CDK5 在肥胖小鼠脂肪组织中异常激活,AMPK α 2 的活性显著降低。同时,AMPK α 2 345 和 529 位丝氨酸满足 Cdk5 的底物一般都具有特定 S/TPXK/R 序列的条件。据此推测:活化的 CDK5 能够磷酸化 AMPK α 2 345 和 529 位丝氨酸,进而抑制 AMPK α 2 的活性,参与代谢综合征的发病。本课题拟在 3T3-L1 前脂肪细胞上研究 Cdk5 介导的 AMPK α 2 蛋白磷酸化的作用,为代谢综合征和糖尿病的治疗提供新的思路。

【实验内容】 应用 lipofectamine2000 转染技术构建 Cdk5 siRNA 基因的脂肪细胞系 3T3-L1-Cdk5 siRNA 实验组及其阴性对照组细胞系 3T-L1- Mock siRNA(Mock siRNA 为空 siRNA 转染),实验分为 3T3-L1-Cdk5 siRNA 组,3T-L1- Mock siRNA 组和 3T-L1 组,以 AIMV 无血清培养基培养 3T3-L1 细胞,使其自然增殖,于增殖第 3 天起用 TNF- α 作用于增殖中的 3T3-L1 细胞,之后每 24 小时以 MTT 法观察细胞增殖情况;采用含胰岛素、地塞米松与 IBMX 的分化培养基诱导分化 3T3-L1 细胞,于诱导分化第 8 天起用 TNF- α 作用于分化中的 3T3-L1 细胞,此后每 3 天以油红 O 染色并染料提取的半定量方法及细胞内甘油三酯测定的方法了解细胞内脂质含量;采用细胞 Cdk5/P35 和 AMPK α 2 激酶活性定量检测试剂盒检测 3T3-L1 细胞中 Cdk5 和 AMPK α 2 的活性,蛋白质印迹的方法检测 3T3-L1 细胞 AMPK α 2^{S345}、AMPK α 2^{S529} 及 AMPK α 2^{S345}、^{S529} 磷酸化水平。从而观察 CDK5 介导的 AMPK 磷酸化对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖及分化的影响。

【材料】 3T3-L1 前脂肪细胞,AIM-V medium,DMEM/F12 培养基,Cdk5 siRNA,AMPK α 2 激酶活性定量检测试剂盒,油红 O,CO2 细胞恒温培养箱。

【可行性】 Cdk5 是脯氨酸引导的丝/苏氨酸蛋白酶,特异性磷酸化其底物蛋白的丝氨酸和苏氨酸位点。其磷酸化底物一般都有特定的 S/TPXK/R 序列。而人、大鼠和小鼠 AMPK α 2 蛋白序列的自动抑制区 345 位丝氨酸和亚单元结合区域 529 位丝氨酸有共同的序列 YLASSPPSGS 和 TGSTLSSVSP,满足 Cdk5 的底物一般都具有特定的 S/TPXK/R 序列的条件,实验假设理论上具有可行性。

【创新性】 本课题以 Cdk5 介导 AMPK α 2 磷酸化进而抑制其活性为切入点,探讨对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖